

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Armando Vale, bacc. ing. agr.

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

smjer Zaštita bilja

UTJECAJ INSEKTICIDA TIAMETOKSAM NA
ENTOMOPATOGENE NEMATODE
Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Armando Vale, bacc. ing. agr.

Sveučilišni diplomski studij Bilinogojstvo

smjer Zaštita bilja

UTJECAJ INSEKTICIDA TIAMETOKSAM NA
ENTOMOPATOGENE NEMATODE
Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Emilija Raspudić, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Majić, mentor
3. doc. dr. sc. Ankica Sarajlić, član

Osijek, 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Entomopatogene nematode	3
2.1.1. Odnosi nematoda i ostalih organizama u tlu	4
2.1.2. Načini pronalaženja i parazitacije domaćina	5
2.1.3. Okolišni uvjeti potrebni za parazitizam i preživljavanje entomopatogenih nematoda	7
2.2. <i>Steinernema feltiae</i>	9
2.3. <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	10
2.4. Uzgoj entomopatogenih nematoda u laboratoriju	11
2.5. Uvjeti skladištenja entomopatogenih nematoda	13
2.6. Primjena entomopatogenih nematoda	13
2.7. Kombinacije entomopatogenih nematoda sa sredstvima za zaštitu bilja	13
2.8. Insekticidi	15
2.8.1. Tiametoksam	15
3. MATERIJAL I METODE	17
4. REZULTATI	21
5. RASPRAVA	24
6. ZAKLJUČAK	26
7. POPIS LITERATURE	27
24. SAŽETAK	30
25. SUMMARY	31
PRILOZI	32
POPIS TABLICA	32
POPIS SLIKA	33

POPIS KRATICA

EPN – entomopatogene nematode

IJ- „infective juvenile“ – infektivna ličinka

SZB – sredstva za zaštitu bilja

HB – *Heterorhabditis bacteriophora*

SF – *Steinernema feltiae*

1. UVOD

Suvremenom poljoprivrednom proizvodnjom nemoguće je osigurati dovoljne količine hrane za prehranu stanovništva bez uspješnih mjera suzbijanja štetnih organizama. Tu je i dodatni problem pojave rezistentnosti štetnih organizama radi monokulture, odnosno uzgoja jedne kulture na jednoj te istoj površini, kao i radi korištenja sredstava na osnovi istih djelatnih tvari. Poljoprivredna proizvodnja postaje sve intenzivnija, a štetni organizmi su neizbježni i iz tog razloga kemijska sredstva za zaštitu bilja postaju najvažnija mjera zaštite kulturnog bilja i to još od druge polovice 20. stoljeća pa sve do danas (Bokulić i sur., 2015.). Štetni organizmi na kulturnim biljkama mogu prouzročiti štetu od 100 % ukoliko se ne tretiraju na vrijeme, a Majić (2014.) navodi da u prosjeku oko 40% štete svake godine na usjevima je posljedica ishrane herbivora. Zbog svega navedenog porasla je i proizvodnja kemijskih sredstava za zaštitu bilja u svijetu i to za nekih 11 % godišnje. Carvalho (2017.) je u svojem radu naveo kako je to bilo nekih 0,2 milijuna tona sredstava 1950.-tih te se popelo na više od 5 milijuna tona u 2000.-toj godini. Problem je i porast svjetske populacije jer se očekuje povećanje poljoprivrednih površina prenamjenom drugih površina u poljoprivredne ili povećanje prinosa po jedinici površine. Pošto ljudima trebaju razni resursi nemoguće je neprestano povećanje poljoprivrednih površina prenamjenom, pa se daje prednost povećanjem prinosa po jedinici površina što zahtijeva korištenje dodatnih sredstava za zaštitu bilja. Kemijska sredstva za zaštitu bilja su jako efikasna, ali su toksična za ljude i okoliš osim za štetne organizme, te je iz toga razloga potrebno racionalizirati primjenu kemijskih sredstava za zaštitu bilja i uvesti neke druge metode zaštite bilja. Prva i glavna metoda za smanjenje broja štetnika je agrotehnika, iza nje bi trebala biti biotehnička i biološka, a tek kao posljednja kemijska. Navedeno su principi integrirane zaštite bilja. Kod intenzivne proizvodnje se još uvijek velika prednost daje kemijskim sredstvima. Jedan od načina kako smanjiti potrebu za korištenjem kemijskih sredstava je i primjena entomopatogenih nematoda (EPN).

EPN su mikroskopski organizmi nalik na male crve te su poznati kao biološko sredstvo u suzbijanju štetnih kukaca. Biološka kontrola štetnih kukaca je uvođenje nekih patogenih ili parazitskih vrsta organizama (korisnih kukaca, nematoda, grinja, virusa, bakterija ili gljivica) u poljoprivrednoj proizvodnji. EPN koje se koriste u suzbijanju štetnika pripadaju porodicama Steinernematidae, Heterorhabditidae i Mermithidae. Ove nematode nalazimo u tlu, ali javljaju se u maloj brojnosti ili uopće nisu prisutne u tlu, te

se uzgajaju u laboratoriju da bi se kasnije mogle primijeniti na neku kulturnu površinu ili u nekom zatvorenom prostoru u kojem se uzgajaju kulturne biljke. Ova mjera suzbijanja je jako dobra pošto EPN suzbijaju veliki broj ekonomski značajnih štetnika te u kombinaciji s kompatibilnim kemijskim sredstvima za zaštitu bilja one predstavljaju važnu komponentu u integriranoj zaštiti bilja, kako zbog učinkovitosti tako i zbog ekonomske računice.

Upravo to je i cilj ovog rada, utvrditi utjecaj različitih koncentracija insekticida na osnovi djelatne tvari tiametoksam na mortalitet i patogenost EPN (*Heterorhabditis bacteriophora* i *Steinernema feltiae*).

2. PREGLED LITERATURE

2.1.1. Entomopatogene nematode

Nematode su među najbrojnijim organizmima na Zemlji, a nalazimo ih u skoro svim mogućim staništima i ekosustavima, uključujući i vodene ekosustave. U rizosferi, postoje slobodno živuće i parazitske nematode. Parazitske nematode se dijele na štetne i korisne te se upravo njima pridaje najviše pažnje u raznim istraživanjima i to zbog šteta koje mogu nanijeti kulturnim biljkama, stoci i ljudima. Nekoliko grupa parazitskih nematoda (entomofilne i entomopatogene) su korisne jer se koriste kao biološko sredstvo suzbijanja štetnih kukaca u poljoprivredi i šumarstvu (Campos- Herrera, 2015.).

Steinernematidae i Heterorhabditidae su najznačajnije dvije porodice EPN (Shapiro-Ilan i sur., 2012.). EPN su po prvi put uočene u 17. stoljeću kada su Aldrovandi (1623.) i Lister (1671.) u kukcima pronašli dugačke crviće. Kada su Glaser i sur. (1930.) uzgojili dovoljan broj EPN, proveli su prvi pokušaj biološkog suzbijanja japanskog pivca (*Popillia japonica*) u poljskom pokusu. Nakon dva tjedna od aplikacije uočili su da se parazitacija japanskog pivca (*Popillia japonica*) kretala od 0,3 do 81 %. Nažalost su se od tada, pa do 1960.-te godine zbog masovne proizvodnje pesticida zanemarile EPN (Oštrec, 2000.). Prva EPN vrsta je opisana 1923. godine (Steiner, 1923.), a poznata je kao *Aplectana kraussei* (danas *Steinernema kraussei*). Rod *Heterorhabditis* je opisan 1976.-te, a simbiotska bakterija u *H. bacteriophora* je okarakterizirana kao *Xenorhabditis luminescens* (danas *Photorhabdus luminescens*) jer uginuli kukac svijetli u mraku (Poinar i Grewal, 2012.). Ukoliko se EPN nađu u stresnim uvjetima okoline, imaju sposobnost formiranja tzv. dauer ličinke (infektivna ličinka) koja je otpornija u odnosu na druge stadije. Infektivne ličinke nisu kao ostali stadiji EPN, mogu preživjeti i po nekoliko mjeseci bez hrane. Ovaj stadij ima i ključnu ulogu kod rasprostranjivanja EPN u tlu dok aktivno traže i inficiraju tijelo kukca domaćina. Infektivne ličinke su zapravo te koje su zaslužne za prenošenje entomopatogenih bakterija (Campos-Herrera, 2015.).

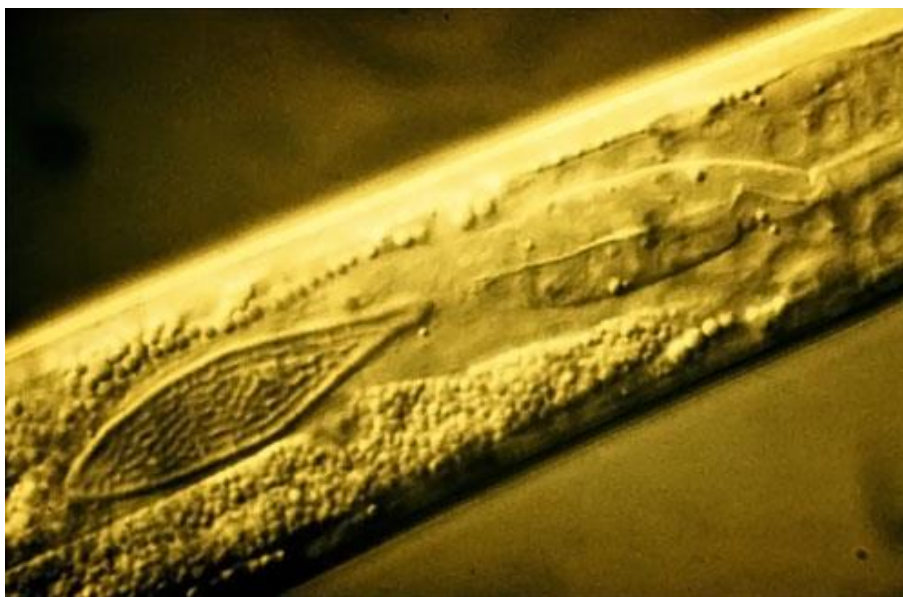
Učinkovitost EPN (*Steinernema* i *Heterorhabditis*) da ubije kukca domaćina je povezano s već spomenutim simbiotskim bakterijama iz rodova *Xenorhabdus* i *Photorhabdus*. Iako se ove bakterije mogu umjetno asociirati i s drugim vrstama nematoda, najbolja asocijacija je na njihovim prirodnim simbiontima (*Steinernema* i *Heterorhabditis* vrste), a ova simbioza pozitivno utječe i na produkciju ovih nematoda. Prema podacima iz 2017.-te godine rod *Steinernema* ima 100-tinjak vrsta, a *Heterorhabditis* 20 i ove brojke se stalno povećavaju (Lulamba i sur., 2019.).

2.1.2. Odnosi nematoda i ostalih organizama u tlu

Nematode u tlu u interakciji su sa mnogim organizmima kao što su gljive, virusi, bakterije, protozoe, virnjaci, druge nematode, grinje, parazitoidi i mnogi drugi organizmi. S nekim organizmima žive u simbiozi dok im drugi rade štetu. Za EPN, koje su nama korisne, su npr. štetne nematofagne gljive i grinje.

Postoje 4 vrste interakcija između EPN i kukaca a to su; komensalizam (interakcija u kojoj insekti nematodama služe kao transport (vektori) i to bi bila fakultativna forezija), saprofitski odnos (entomofilne nematode - nematode kod ovakvog tipa odnosa ulaze u kukca (živog ili uginulog), te nakon njegove smrti uzimaju sve što im je potrebno za život i razmnožavanje), fakultativni parazitizam (nematoda živi u domaćinu, ali može preživjeti i bez domaćina), te obligatni parazitizam (entomopatogene nematode - nematoda živi u domaćinu i potreban joj je domaćin da preživi, odnosno živi na račun domaćina) (Dillman i sur., 2012.).

Osim interakcija sa kukcima nematode imaju i 3 vrste interakcija sa bakterijama, a to su; trofizam (gdje bakterije služe nematodama kao hrana), parazitizam (kod kojeg ukoliko nematode nisu rezistentne, patogene bakterije uzrokuju bolesti), te mutualizam (u kojem nematode i bakterije žive u nekom obliku simbioze gdje i jedna i druga strana imaju beneficije što je vidljivo iz slike 1.) (Dillman i sur., 2012.)



Slika 1. Simbiotska bakterija u probavnom sustavu nematode

Izvor: <http://entnemdept.ufl.edu>

2.1.3. Načini pronalaženja i parazitacije domaćina

Učinkovitost EPN ovisi o puno bioloških faktora, što uključuje vrstu nematode, vrstu kukca i njihovom razvojnem stadiju. EPN kod nekih kukaca imaju problema sa pronalaženjem domaćina, prijanjanjem na domaćina, te penetracijom u domaćina.

Faktori koji utječu na smanjenu učinkovitost EPN:

1. Česta defekacija koja smanjuje mogućnost infekcije kroz analni otvor (pr. grčice hrušta; *Melolontha melolontha*);
2. Kukac izbacuje premalo CO₂ ili CO₂ izbacuje sporadično što smanjuje kemijske tragove (pr. kukuljice leptira; *Lepidoptera* i grčice hrušta; *Melolontha melolontha*);
3. Formiranje tvrdih kukuljica ili stanice tla koje služe kao fizička barijera (pr. Leptiri; *Lepidoptera* i listorošci; *Scarabaeidae*);
4. Ograđivanje zaraženih individua da bi se izbjegla ili smanjila kontaminacija ostalih kukaca u leglu (pr. Termiti; *Isoptera*);
5. Način kretanja kojim se izbjegavaju nematode odnosno smanjuje kontakt sa infektivnim ličinkama (pr. grčice hrušta; *Melolontha melolontha*) (Chen i sur., 2004.).

EPN, odnosno 3. stadij ličinke ili infektivne ličinke koje parazitiraju kukce, prema strategiji traženja domaćina se dijele na napadače iz zasjede i aktivne tragače. Aktivni tragači se aktivno kreću kroz tlo i pomoću kemijskih tragova koje kukac ostavlja oni ga nalaze. Napadači iz zasjede se zadržavaju blizu površine tla i oni podižu svoje tijelo na način da se oslone na rep te im je skoro cijelo tijelo u zraku, a mogu i odskočiti, što olakšava prijanjanje na kukca u prolazu (Belien, 2018.).

Infektivne ličinke ulaze u domaćina kroz prirodne otvore (oralno, analno ili kroz stigme). *H. bacteriophora* koristi dorzalnu kuku (tvrda tvorevina nalik zubu) pomoću koje probija u kukca, te se dugo vjerovalo da samo *Heterorhabditis* ima tu mogućnost pošto *Steinernema* nema taj zub, ali se došlo do saznanja da i *S. feltiae* ima mogućnost probijanja kroz kožu kukca. Jednom kada infektivna ličinka dospije u kukca ona otpušta bakterije u hemolimfu. Kada su bakterije otpuštene u kukca, one proizvode razne spojeve (uključujući toksine) koji potiskuju imuni sustav kukca. Iz tog razloga kukac umire od sepse ili toksemije u roku od 48 sati. Leš kukca u kojem se nalazi bakterija iz roda *Photorhabdus* postaje crvenkast (Slika 2.) zbog produkcije antrakinon pigmenta te svijetli u mraku zbog

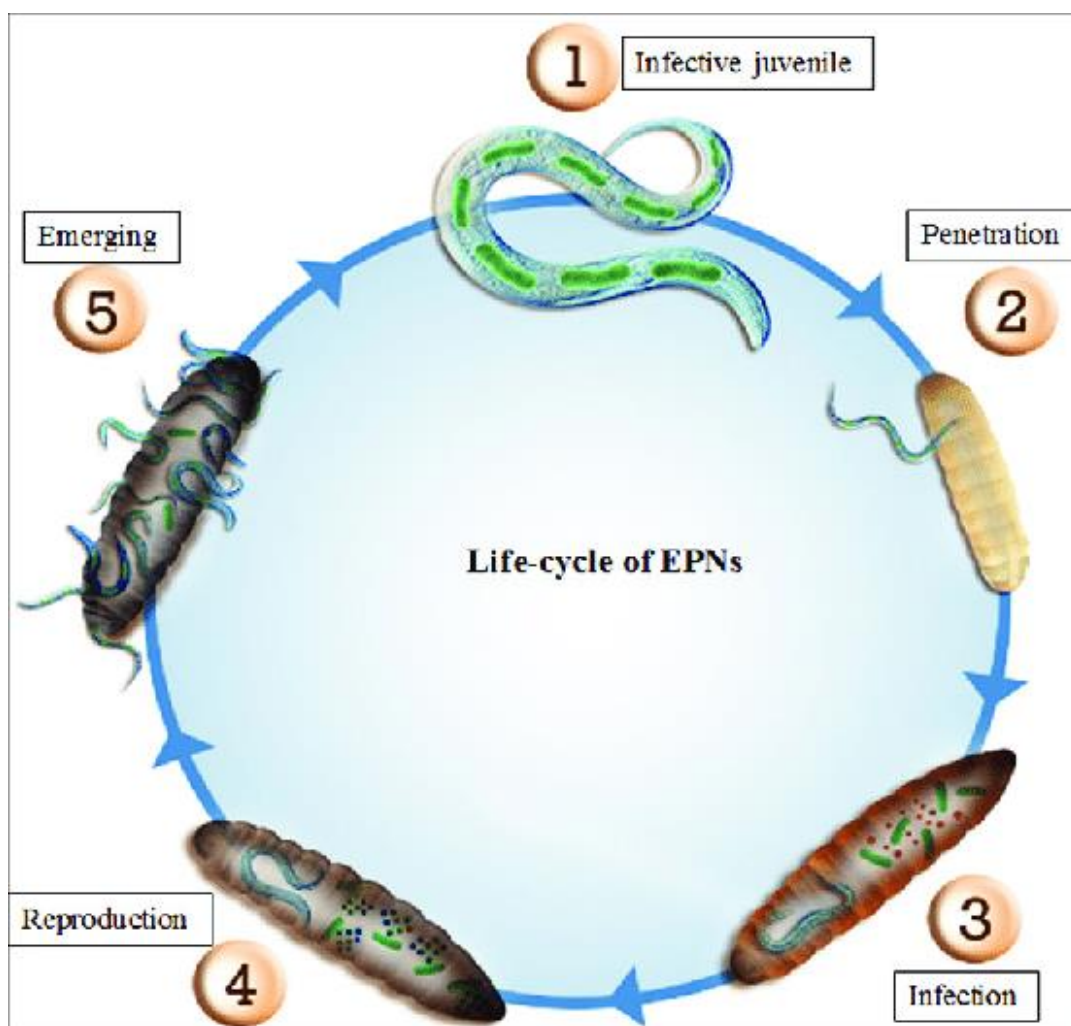
luks gena. Leševi kukca zaraženi s *Xenorhabdus* bakterijom postaju bež ili smeđe boje (Gulcu i sur., 2017.).



Slika 2. Veliki voskov moljac (*Galleria mellonella*) prije i poslije zaraze EPN

Izvor: <https://www.invasive.org>

Infektivne ličinke se hrane na multiplicitiranim bakterijskim stanicama i tkivom domaćina koje je bilo metabolizirano od strane simbiotskih bakterija. Bakterije iz roda *Xenorhabdus* i *Photorhabdus* osim toksina proizvode i antibiotske spojeve čime se sprječava kontaminacija raznim mikrobima i još uz to odbija razne strvinare (pr. ptice) i omnivore (ose; *Vespula vulgaris*, žohari; *Blatodea* i sl.) da se na miru hrane na kukcu koji je ubijen od strane nematoda (Gulcu i sur., 2017.).



Slika 3. Životni ciklus EPN
Izvor: <https://www.researchgate.net>

2.1.4. Okolišni uvjeti potrebni za infekciju i preživljavanje entomopatogenih nematoda

Na opstanak i rasprostranjenost infektivnih ličinki utječu razni biotski i abiotski (temperatura, vlaga, tekstura tla, salinitet tla, UV zračenje, kisik i pH) čimbenici u tlu. Jedan od ključnih faktora za opstanak EPN je temperatura. Temperature ispod 0 °C i iznad 40 °C su letalne za većinu vrsta EPN. Infektivne ličinke bolje podnose niže temperature od viših (iznad 37 °C). Da bi preživjele niske temperature infektivne ličinke koriste razne mehanizme: izbjegavaju smrzavanje ili razvijaju otpornost prema niskim temperaturama. *S. feltiae* i *H. bacteriophora* mogu biti tolerantne prema niskim temperaturama i/ili koristiti krioprotektivnu dehidraciju kao zaštitu od niskih temperatura. Tolerantnost EPN prema visokim temperaturama je povezana sa HSP (engl. *heat shock proteins*) proteinima.

Vlaga je najvažniji faktor u opstanku EPN. One koriste film vode u tlu kako bi se kretale. Ukoliko je tlo pre vlažno smanjuje se količina kisika zbog čega bude i kretanje nematoda ograničeno. U uvjetima smanjene vlažnosti smanjuje se i virulentnost EPN, ali se rehidracijom (navodnjavanjem) opet poveća. Infektivnost EPN je najveća u umjereno vlažnim tlima (-10 do 100 kPa) a manja u vlažnijim (-1 kPa) i umjereno suhim (-1000 kPa) tlima.

Što se tiče teksture tla, glinasta tla imaju najmanju stopu preživljavanja nematoda zbog niske količine kisika, zbog čega se smanjuje njihova mobilnost i infektivnost. Sve vrste EPN se najbolje kreću u pjeskovitoj ilovači. Što se tiče pH, infektivne ličinke mogu preživjeti u širokom rasponu pH, i to između 4 i 8, a pH iznad 10 djeluje štetno na njih.

Što se tiče prirodnih neprijatelja najveću pažnju se pridaje nematofagnim gljivama (*Hirsutella rhossiliensis*). Odmah nakon njih su nematofagne grinje (*Scheloribatides latipes*, *S. rigdisetosus* i *S. laevigatus*) koje su učinkoviti predatori EPN. Osim prirodnih neprijatelja i biljke imaju utjecaj na EPN, odnosno njihovo korijenje. Ima zapisa gdje je korijenje citrusa imalo pozitivan učinak na preživljavanje nekih vrsta EPN, te oštećeno korijenje ispušta određene kemikalije koje privlače EPN (Gulcu i sur., 2017.).

2.2. *Steinernema feltiae* (Filipjev)

S. feltiae pripada redu Rhabditida, porodici Steinernematidae i rodu *Steinernema*. Ove EPN su u simbiozi sa bakterijom iz roda *Xenorhabdus* (*Xenorhabdus nematophilus*) te se koriste u suzbijanju raznih mušica, pipa, zlatica i drugih štetnika (Chen i sur., 2004.). Po strategiji traženja domaćina ona kombinira iz zasjede i traganjem (Gaugler i Bilgrami, 2004.) te zadržava infektivnost na niskim temperaturama tla, čak i ispod 10 °C. Ova vrsta nematoda ima relativno nisku stabilnost u formulaciji i kratko žive. Formulacije ovih EPN su alginatni gel, vodo-dispergirajuće granule, vermikulit te močivo prašivo (Miles i sur., 2012.). Ličinke i gusjenice napadnute *S. feltiae* je lako za prepoznati jer dobivaju bež ili smeđu boju što je vidljivo iz slike 4 (Gulcu i sur., 2017.).

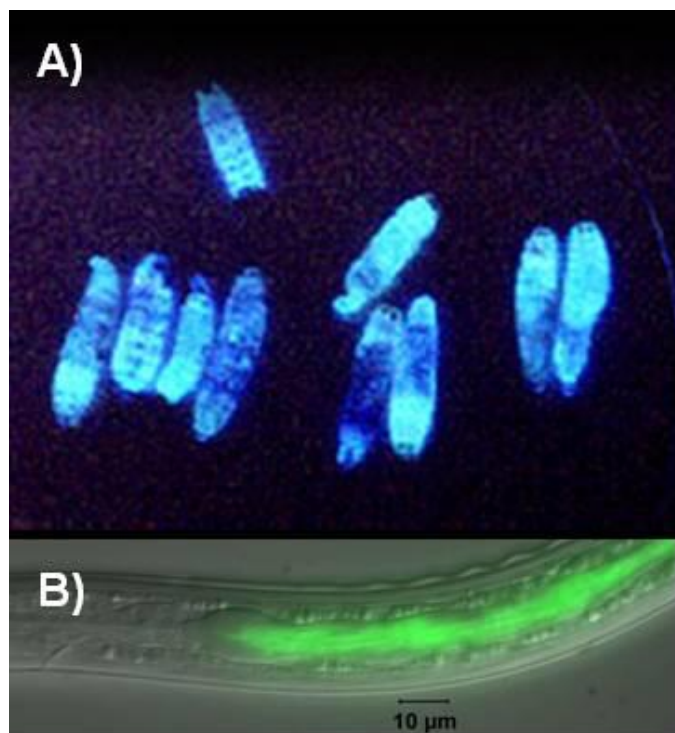


Slika 4. Ličinke kukca zaražene s *Steinernema feltiae*

Izvor: <http://entnemdept.ufl.edu>

2.3. *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar)

Ova vrsta nematoda je vektor *Photorhabdus* bakterija (*Photorhabdus luminescens*). One se se lako prepoznaju po fluorescenciji, pa leš kukca inficiran nematodama iz roda *Heterorhabditis* svijetli u mraku (Poinar i Grewal, 2012.). Osim prema morfološkim osobinama, *H. bacteriophora* se razlikuje od *S. feltiae* po tome što su njihove prve generacije ličinki hermafroditi (Campos-Herrera, 2015.).



Slika 5. Ličinke velikog voskovog moljca (*G. mellonella*) zaražene s *H. bacteriophora* (A) i svjetleća bakterija *P. luminescens* u probavi nematode (B)

Izvor: <https://microbewiki.kenyon.edu>



Slika 6. Grčica hrušta (*Melolontha melolontha*) zdrava i zaražena s *H. bacteriophora*

Izvor: <http://ipm.ucanr.edu>

2.4. Uzgoj entomopatogenih nematoda u laboratoriju

Kao kod svih organizama, tako se i kod EPN javlja to da se organizmi koji se uzgajaju u laboratoriju naviknu na uvjete života u laboratoriju te izgube osobine i svojstva koje im pomažu da prežive u poljskim uvjetima. To se javlja ukoliko se više generacija EPN uzastopno uzgajaju u laboratoriju. Neki od načina da se to spriječi je da se svake 2 godine ponovno izoliraju prirodne populacije EPN, da se uspostave „divlje populacije“ ili da se promijeni metodologija uzgoja u laboratoriju (Campos-Herrera, 2015.).

Postoje dvije metode proizvodnje nematoda u laboratoriju: *in vivo* i *in vitro*. *In vivo* metoda se sastoji od inokulacije, žetve, koncentracije i dekontaminacije (ukoliko je potrebno). Kukac domaćin je inokuliran u posudi s filter papirom ili nekim drugim supstratom koji je pogodan za infekciju nematoda. Nakon približno 2 – 5 dana, inficirani kukci su prebačeni u tzv. White-ove zamke (Slika 7.). White-ove zamke se sastoje od posude u kojoj su poslagani uginuli kukci i okruženi su vodom. Infektivne ličinke izlaze iz leša kukca u vodu koja ih okružuje i tada se prikupljaju.



Slika 7. White-ova zamka za izdvajanje nematoda

Izvor: <https://www.researchgate.net>

Kod *in vitro* metode proizvodnje nematoda koristi se metoda s tekućim i krutim medijem. *In vitro* u krutom mediju metoda se bazira na uvođenju nematoda u čistu kulturu njihovog simbionta u nutritivnom mediju. Tekući medij se sastoji od mnogih sastojaka a neki od njih su sojino brašno, ekstrakt kvasca, ulje uljane repice, kukuruzno ulje, ulje čička, žumanjak, peptid kazeina, mlijeko u prahu i kolesterol. Dužina trajanja kod ove metode može ovisiti o mediju i vrsti, a može trajati i do 3 tjedna, iako većina vrsta EPN dostiže maksimum proizvodnje infektivnih ličinki nakon 2 tjedna ili manje. Nakon završetka procesa nematode se ekstrahiraju iz medija centrifugom (Shapiro-Ilan i sur., 2012.).

2.5. Uvjeti skladištenja entomopatogenih nematoda

EPN se inače konzerviraju, skladište i apliciraju u vodenoj suspenziji, te se mogu aplicirati sa konvencionalnim prskalicama. Aplikacija EPN u obliku peleta je limitirana, a to je isključivo zbog toga jer se razvijaju bolje formulacije. Na učinkovitost EPN u kontroli štetnih kukaca mogu utjecati karakteristike peleta, kao što je homogenost (oblik, veličina, količina nematoda i težina), struktura, mehanička otpornost i svojstva inertnih granuliranih materijala. Enkapsulirane *S. feltiae* su nakon 6 tjedana skladištenja na temperaturi od 25 °C imale više od 90 % preživjelih u granulama (Gulcu i sur., 2017.).

EPN se mogu skladištiti do nekoliko mjeseci u vodi u ohlađenim spremnicima sa mjehurićima ali zbog visokih troškova se to ne radi u praksi. Faktori koji utječu na nematode tokom skladištenja u vodi su da zahtijevaju puno kisika, neke vrste nematoda su osjetljive na niske temperature te osjetljivost na kontaminaciju mikrobima. *H. bacteriophora* se najčešće nalazi u formulaciji spužve, a *S. feltiae* kao vermikulit, alginatni gel, močivo prašivo te vodeno-dispergirajuće granule (Gaugler, 2002.).

2.6. Primjena entomopatogenih nematoda

Za primjenu EPN protiv štetnih kukaca mogu se koristiti različite prskalice i atomizeri. Osim toga još se mogu primjenjivati i kroz sustav za navodnjavanje. U svakom slučaju postoje različita razmatranja o rukovanju, uključujući volumen, miješanje, vrsta mlaznice, tlak te uvjeti okoline. Infektivne ličinke mogu proći kroz cijev za raspršivanje promjera barem 500 µm i sposobne su izdržati pritisak do 2000 kPa bez štetnosti za njih. Pošto su IJ osjetljive na UV zračenje i sušenje, preporuča se EPN primjenjivati rano ujutro, navečer ili na oblačan dan, kad su radijacija i sušenje minimalni ili ne postoje.

2.7. Kombinacije entomopatogenih nematoda sa sredstvima za zaštitu bilja

SZB se često poistovjećuju s pesticidima, no pojam pesticidi obuhvaća velik broj tvari koje se ne koriste samo u poljoprivredi već i u drugim područjima (javno zdravstvo, higijena, veterinarstvo i drugo). SZB su zapravo pripravci u obliku u kojem se isporučuju korisniku, koja se sastoje ili koja sadrže djelatne tvari i dodatne ne pesticidne tvari i koja su namijenjena za:

1. Zaštitu bilja ili biljnih proizvoda od štetnih organizama

2. Djelovanje na životne procese bilja (bio stimulatori)
3. Konzerviranje biljnih proizvoda
4. Uništavanje neželjenog bilja ili dijelova bilja
5. Sprječavanje ili suzbijanje neželjenog rasta bilja (Bokulić i sur., 2015.)

EPN spadaju u prvu skupinu odnosno u „zaštitu bilja ili biljnih proizvoda od štetnih organizama“ i kao što je već spomenuto EPN spadaju u biološku kontrolu štetnih organizama.

EPN se često primjenjuju na površinama na koja se stalno nanose neka kemijska sredstva za zaštitu bilja. Poželjno je i to da se u spremnik prskalice stave 2 ili više različitih sredstva da bi se uštedio novac i vrijeme. EPN su tolerantne pri kratkoj izloženosti (2 – 6 h) na većinu kemijskih sredstava (herbicidi, fungicidi, akaricidi i insekticidi) te se iz tog razloga mogu miješati sa različitim sredstvima (Gaugler, 2002.).

Interakcija između EPN i ostalih sredstava za zaštitu bilja (SZB) (biološka ili kemijska) može biti sinergistička, antagonistička ili da nema utjecaja, što ovisi o sredstvu. Npr. u nekoliko istraživanja je dokazano da je kombinacija EPN sa neonikotinoidima sinergistička, odnosno da zajedno uzrokuju veći mortalitet kukca nego zasebno. Isto tako dokazalo se i da su neka kemijska sredstva djelovala antagonistički i uzrokovala neželjene nuspojave na EPN (npr. miješanje *Steinernema scarabaei* i imidakloprida) (Belien, 2018.). Osim vrste kemijskog sredstva, različite formulacije istog sredstva imaju različite razine toksičnosti na EPN. Heterorhabditis vrste su osjetljivije na fizičke izazove od Steinernematidae (Gaugler, 2002.).

2.8. Insekticidi

Insekticidi su sredstva za suzbijanje štetnih kukaca te spadaju u skupinu „zoocida“. Prema načinu djelovanja razlikuju se ne sistemski i sistemski insekticidi (Bokulić i sur., 2015.). Djelatna tvar tiametoksam je izraziti sistemski insekticid umjerene perzistentnosti a dozvoljen je za suzbijanje zemljišnih štetnika (Bažok i sur., 2019.).

2.8.1. Tiametoksam

Tiametoksam je djelatna tvar iz skupine neonikotinoida te ima širok spektar djelovanja. Registriran je za uporabu na brojnim usjevima. Ova djelatna ima kontaktno i želučano djelovanje (Hamilton, 2010.) te spada u drugu generaciju neonikotinoida. Prvi puta je sintetizirana 1991. godine a sad je prilagođena za upotrebu u cijelom svijetu na velikom broju usjeva (Maienfisch, 2006.). Na tržištu je pod zaštitnim znakovima Actara (folijarno i za tretiranje tla) i Cruiser (za tretiranje sjemena). Ovaj insekticid je pogodan za moderne integrirane programe suzbijanja štetočina u mnogim usjevima i to baš zbog toga jer je učinkovit i fleksibilan što se tiče metode primjene (Maienfisch i sur., 2001.). Na Hrvatskom tržištu za 2019. godinu registrirana su četiri sredstva koja sadrže djelatnu tvar tiametoksam; Actara 25 WG, Cruiser 70 WS, Cruiser FS 350 i Maxim top. Ova 4 sredstva su proizvod farmaceutske kuće Syngenta. Actara 25 WG se smije primjenjivati samo u zaštićenom prostoru a koristi se u zaštiti velikog broja biljaka (krastavci; *Cucumis sativus*, patlidžan; *Solanum melongena*, paprika; *Capsicum anuum*, rajčica; *Solanum lycopersicum*, *Citrullus lanatus*, dinja; *Cucumis melo*, tikvice; *Cucurbita pepo*, razno ukrasno bilje, salata; *Lactuca sativa* itd.) i djeluje na velik broj štetnih insekata (razne uši; *Aphidoidea*, štitasti moljci; *Trialeurodes vaporariorum*, tripsi; *Thysanoptera* itd.). Može se koristiti preko sistema kap po kap, zalijevanjem korijena i prskanjem. Cruiser 70 WS i Cruiser FS 350 se koriste kod šećerne i stočne repe i to za tretiranje sjemena protiv atomarija (*Atomaria*), žičnjaka (*Agriotes*), lisnih ušiju (*Aphidoidea*), buhača (*Chaetocnema tibialis*), repine muhe (*Pegomya hyoscyam*) i pipe (*Bothynoderes punctiventris*). Maxim Top se koristi isto za tretiranje sjemena ali kod žitarica i to protiv žičnjaka (*Agriotes*), crnog žitarca (*Zabrus tenebrioides*) i lisnih ušiju (*Aphidoidea*) (Bažok i sur., 2019.).

Što se tiče rezistentnosti kukaca, El Hassani i sur., 2008. su sprovedli istraživanje na pčelama (*Apis mellifera*) i kroz to istraživanje su došli do zaključka da tiametoksam nema

utjecaj na mortalitet pčela (*Apis mellifera*). Osim toga tiametoksam nije imao nekog značajnog utjecaja na lokomotornu aktivnost pčela.

Gao i sur., 2014. su sproveli istraživanje o rezistentnosti kalifornijskog tripsa (*Frankliniella occidentalis*) na tiametoksam. Stvorili su povoljne uvjete za *F. occidentalis* i promatrali rezistentnost kroz 55 generacija toga insekta. Rezultati su pokazali da se rezistentnost postepeno javlja i to jako sporo kroz prvih 13 generacija a od 14.-te do 22.-e se javila jako brzo.

Horowitz i sur. 2004. su istražili rezistentnost duhanovog štitastog moljca (*Bemisia tabaci*) na tiametoksam. Došli su do zaključka da ovaj insekt srednje brzo do brzo stvara rezistentnost na tiametoksam ovisno o lokaciji uzgoja, što znači da i ostali parametri imaju efekta na pojavu rezistentnosti.

3. MATERIJAL I METODE

U laboratoriju za nematologiju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek proveden je pokus u kojem je ispitan utjecaj insekticida na osnovi djelatne tvari tiametoksam (Actara 25 WG) na dvije vrste EPN: *H. bacteriophora* ISO9 i *S. feltiae* ISO18. Pokus je postavljen 20.05.2019. godine s vrstom *H. bacteriophora* i 01.07.2019. godine s vrstom *S. feltiae* (Slika 9.). Nematode korištene u pokusu su hrvatski sojevi uzgojeni u laboratoriju za nematologiju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti u Osijeku. Nematode su se prije pokusa nalazile u M9 pufernoj otopini iz koje ih je trebalo izdvojiti (Slika 8.). Nematode iz posudica za uzgoj kultura su prebačene u Falcon tubice i centrifugirane su. Nakon procesa centrifuge, supernatant je odbačen a nematode su isprane destiliranom vodom dva puta te je postupak centrifugiranja ponovljen.



Slika 8. Nematode pod mikroskopom prije izdvajanja i centrifugiranja

Foto: A. Vale, 2019.

Pokus je proveden u laboratorijskim uvjetima, u Petrijevim zdjelicama s 3 tretmana i u 4 ponavljanja, a kontrolni tretmani provedeni su u destiliranoj vodi. Nematode su testirane u koncentraciji od 100 i 120 % preporučene doze insekticida. Preporučena doza za Actara 25 WG je kod primjene prskanjem u količini 20-30 g/100 L vode, uz utrošak vode 500-1500 L/ha a kod zalijevanjem korijena ili preko sustava za navodnjavanje kap po kap maksimalno dozvoljena količina sredstva pri primjeni je 400 g/ha.

Svaka Petrijeva zdjelica je sadržavala 5 mL otopine s prosječnom koncentracijom nematoda 500, odnosno 100 nematoda mL^{-1} . Vitalnost i mortalitet nematoda utvrđena je izdvajanjem 1 kapljice od 50 μm automatskom pipetom na predmetno stakalce iz svih tretmana i ponavljanja, što je ponovljeno 4 puta. Vitalnost i mortalitet nematoda praćena je kroz 1, 3, 24, 48 i 72 sata nakon miješanja nematoda i insekticida. Nematode su se brojale pod stereomikroskopom (Olympus SZX 16), a ukoliko se nisu micale nakon dodirivanja s nematološkom „pecaljkom“ smatrane su mrtvima. Pokus je proveden u mraku na sobnoj temperaturi.



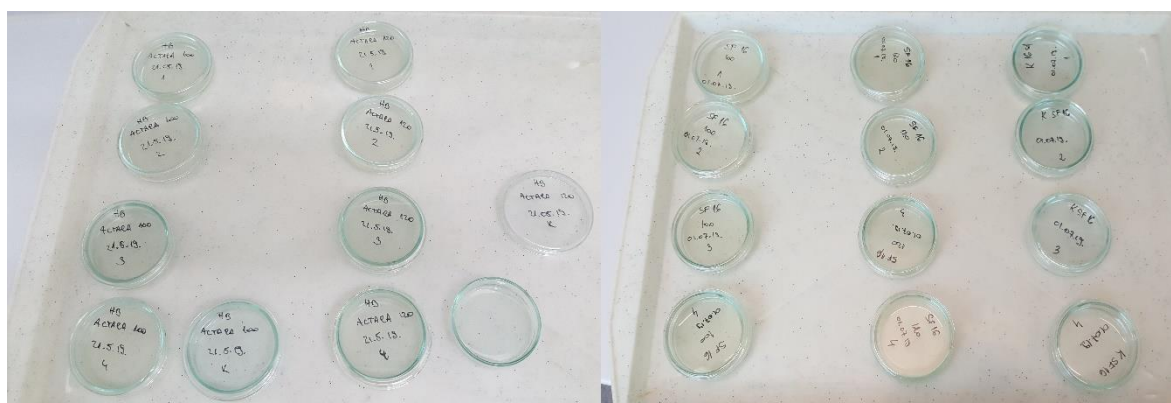
Slika 9. Utvrđivanje mortaliteta nematoda

Izvor: A. Vale, 2019.



Slika 10. Postavljanje pokusa

Foto: A. Vale, 2019.

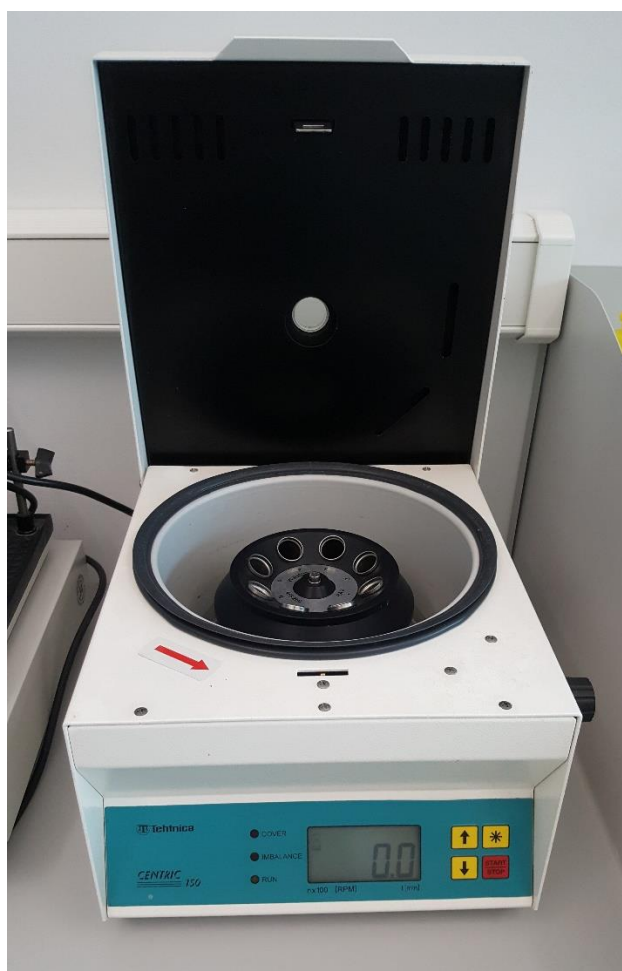


Slika 11. EPN u Petrijevim zdjelicama sa različitim koncentracijama insekticida

Foto: A. Vale, 2019.

Da bi se ispitala infektivnost i patogenost nematoda, nakon provedenog pokusa preživjele nematode su očišćene od ostataka insekticida. Otopine iz tretmana s nematodama iz Petrijevih zdjelica prebačene su u Falcon tubice centrifugirane su 2 min na 2200 okretaja u minuti. Nakon prvog centrifugiranja s automatskom pipetom izvadio se višak vode do 0,5 mL te se dodala destilirana voda. Taj postupak se ponovio još dva puta te se na kraju dodalo 10 mL destilirane vode u Falcon tubice i sve to se prebacilo u hladnjak na čuvanje na 4°C do stavljanja tih nematoda na kukca.

Dobiveni podaci su analizirani standardnim statističkim metodama (GLM i ANOVA), a dobivene srednje vrijednosti su testirane sa Tukey testom na razini signifikantnosti $\alpha = 0,05$.



Slika 12. Centrifuga potrebna za čišćenje i sedimentaciju nematoda

Izvor: A. Vale, 2019.

4. REZULTATI

Tablica 1 prikazuje rezultate GLM analize za kompatibilnost *H. bacteriophora* i insekticida tiametoksam. Vidljiv je utjecaj i visoka statistička značajnost koncentracije insekticida na mortalitet nematoda nakon 72 sata inkubacije. Slično je utvrđeno i za kompatibilnost *S. feltiae* s insekticidom tiametoksam, jer koncentracija insekticida ima visoko značajnu ulogu na mortalitet nematoda (Tablica 2).

Tablica 1. GLM analiza mortaliteta *H. bacteriophora* kroz različiti vremenski period kroz različiti vremenski period proveden u insekticidu

	Broj sati (h) nakon miješanja nematoda sa insekticidom				
	1	3	24	48	72
Vrsta	n.s	n.s	**	**	**
Konc.	n.s	n.s	n.s	*	***
Vrsta*konc.	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s

*Značajnost na razini 95% vjerojatnosti ($P < 0,05$)

**Značajnost na razini 99% vjerojatnosti ($P < 0,01$)

***značajnost na razini 99,99% vjerojatnosti ($P < 0,001$)

Tablica 2. GLM analiza mortaliteta *S. feltiae* kroz različiti vremenski period proveden u insekticidu

	Broj sati (h) nakon miješanja nematoda sa insekticidom				
	1	3	24	48	72
Vrsta	n.s	n.s	**	**	***
Konc.	n.s	n.s	n.s	n.s	***
Vrsta*konc.	n.s	n.s	n.s	n.s	n.s

*Značajnost na razini 95% vjerojatnosti ($P < 0,05$)

**Značajnost na razini 99% vjerojatnosti ($P < 0,01$)

***značajnost na razini 99,99% vjerojatnosti ($P < 0,001$)

Tablica 3 prikazuje srednje vrijednosti tretmana za *H. bacteriophora* i *S. feltiae*. Kod *H. bacteriophora* srednje vrijednosti mortaliteta nematoda nisu se statistički značajno razlikovale ovisno o koncentraciji insekticida prvih 48 sati. Dok je statistički značajna razlika u mortalitetu nematoda za ovu vrstu utvrđena nakon 72 sata, odnosno tretman s 100% koncentracije pesticida se statistički značajno razlikovao od ostalih tretmana.

Tablica 3. Srednje vrijednosti mortaliteta *H. bacteriophora* i *S. feltiae* vrsta u različitim koncentracijama insekticida

Vrsta EPN i Tretman		Broj sati (h) nakon miješanja EPN sa insekticidom				
(% konc. insekticida)		1	3	24	48	72
HB	0	6,25 a	0,00 a	5,55 a	6,25 a	0,00 a
	100	20,70 a	13,22 a	12,65 a	2,50 a	18,81 b
	120	11,23 a	7,04 a	5,40 a	2,72 a	0,00 a
SF	0	4,55 a	14,77 a	22,88 a	5,00 a	10,50 a
	100	4,55 a	17,50 a	21,27 a	18,45 b	27,45 b
	120	9,55 a	5,00 a	24,40 a	15,39 a	23,18 a

Vrijednosti u koloni s različitim slovim označavaju statističku značajnost ($P < 0,05$).

HB – *Heterorhabditis bacteriophora* ISO9

SF – *Steinernema feltiae* ISO18

Kod vrste *S. feltiae* između koncentracija insekticida nije bilo statistički značajne razlike između tretmana nakon 1, 3 i 24 sata inkubacije. Nakon 48 sati inkubacije je statistički značajna razlika utvrđena je nakon 48 i 72 sata, odnosno tretman s 100 % koncentracije pesticida se statistički značajno razlikovao od ostalih tretmana. Nakon 48 sati inkubacije pri 100 % koncentracije pesticida je utvrđen mortalitet od 18,45 % u odnosu na mortalitet kontrolnog tretmana gdje je bio 5 %. Nakon 72 sata inkubacije pri 100 % koncentracije insekticida utvrđen je mortalitet od 27,45 % dok je kod kontrolnog tretmana bio 10,50 %. Prirodni mortalitet *S. feltiae* (do 22,88 %) se pokazao dosta veći uspoređujući s *H. bacteriophora* (do 6,25 %).

Iz tablice 4 je vidljivo da su obje testirane vrste nematoda imale slični mortalitet pri miješanju s insekticidom tiametoksam. Mortalitet *H. bacteriophora* se kretao od 3,16 do 17,91 %, a kod *S. feltiae* je bio od 5,79 do 23,36 %.

Statistički značajna razlika između vrsta nematoda je utvrđena tek nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije u insekticidu. Najniži mortalitet (3,16 %) je utvrđen kod *H. bacteriophora* i to 48 sati nakon inkubacije u insekticidu.

Tablica 4. Srednje vrijednosti mortaliteta nematoda ukupno za obje koncentracije insekticida i razlika između *H. bacteriophora* i *S. feltiae* u kompatibilnosti s insekticidom tiametoksam

Vrsta	Broj sati (h) miješanja nematoda sa insekticidom				
	1	3	24	48	72
HB	14,02 a	8,10 a	8,33 b	3,16 b	17,91 a
SF	5,79 a	13,11 a	23,36 a	10,96 a	7,53 b

Vrijednosti u koloni s različitim slovom označavaju statističku značajnost ($P < 0,05$).

HB – *Heterorhabditis bacteriophora* ISO9

SF – *Steinernema feltiae* ISO18

Praćenjem mortaliteta i vitalnost nematoda ovih dviju vrsta nematoda primijećeno je da je insekticid Actara 25 WG imao stimulativan učinak na preživjele infektivne ličinke *H. bacteriophora*, odnosno one su se živahno kretale. Kod *S. feltiae* u kontrolnom tretmanu su nematode bile živahnije nego u kombinaciji sa insekticidom dok je kod *H. bacteriophora* bio obrnut slučaj. *S. feltiae* se skoro nisu ni micale te se svaku moralo posebno ispitati sa nematološkom „pecaljkom“.

Preživjele nematode su centrifugiranjem isprane tri puta u destiliranoj vodi, te su dodatno ostavljene u vodi da bi eliminirale ostatke pesticida. Nakon 24 h u vodi, testirana je patogenost preživjelih nematoda. U Petrijevim zdjelicama, uspoređena je patogenost preživjelih nematoda i nematoda koje nisu bile u kontaktu s insekticidom. U pokusu s gusjenicama malog voskovog moljca (*Achroia grisella*), nije utvrđena statistički značajna razlika u mortalitetu gusjenica između kontrolnog tretmana i tretmana s preživjelim nematodama.

5. RASPRAVA

Gutierrez i sur. (2008.) su istražili kako određene agrokemikalije djeluju na *S. feltiae*. Testirali su 2 soja nematoda, jedan je ekstraktiran iz prirodne populacije, a drugi je komercijalni (ENTONEM) i oba soja su bila izložena različitim agrokemikalijama 48 sati. Klorpirifos i pirimikarb nisu utjecali na mortalitet nematoda, ali prema cipermetrinu su pokazale određenu osjetljivost. ETONEM soj je pokazao bolju toleranciju u odnosu na prirodni soj. Iako ove agrokemikalije nisu imale velik utjecaj na mortalitet djelovale su subletalno, odnosno negativno su djelovale na njihovu reprodukciju u polju. Iako se su koristili druge skupine insekticida, vide se određene sličnosti s našim istraživanjem, odnosno da agrokemikalije koje su oni koristili nemaju velik utjecaj na mortalitet nematoda.

Koppenhofer i Fuzy (2008.) su istražili kako djeluju različite kombinacije neonikotinoida i EPN protiv ličinki različitih vrsta kukaca. Kod lozinog zlatara (*Anomala orientalis*) i japanskog pivca (*Popillia japonica*), kombinirani tretman *H. bacteriophora* i imidaklopid imao je najdosljedniji synergizam, ali nije izazvala značajno veću smrtnost kukaca od kombinacije *H. zealandica* i imidaklopid. Kod *Cyclocephala borealis* nije vidljivo koja je kombinacija izazvala najdosljedniji synergizam, ali je kombinacija *H. zealandica* i imidaklopid izazvala najviši mortalitet štetnika.

Yan i sur. (2019.) su miješali više različitih insekticida niske toksičnosti sa *S. feltiae*. Četrnaest različitih insekticida nije imalo značajnog efekta na mortalitet i infektivnost *S. feltiae*. Primijećen je synergizam kod miješanja imidakloprida sa *S. feltiae* protiv ličinke *Bradysia odoriphaga*. Rezultati su pokazali da je aplikacija kombinacije EPN sa imidaklopidom uspješno suzbila populaciju ličinki *B. odoriphaga*, čime se značajno povećao prinos uzgajanih kultura.

Koppenhofer i sur. (2000.) su istražili interakciju između imidakloprida i tri različite vrste nematoda u laboratoriju u suzbijanju grčica, a *H. bacteriophora* je bila najkompatibilnija za miješanje s ovim insekticidom. Glavni razlog synergizma između *H. bacteriophora* i imidakloprida je ta da ovaj insekticid oslabljuje normalnu funkciju živčanog sustava što dovodi do smanjene aktivnosti ličinki kukaca te olakšava hvatanje nematoda za kukca domaćina.

Svi navedeni autori su istražili utjecaj barem jednog neonikotinoida u mješavini sa EPN na nekog štetnika. Dosadašnja istraživanja potvrđuju da neonikotinoidi nemaju štetnog

utjecaja na nematode, a slično smo otkrili i u ovom istraživanju pošto je i tiametoksam jedan od neonikotinoida. Osim toga, slično kao i u gore navedenim istraživanjima, preživjele nematode su zadržale svoju infektivnu sposobnost i patogenost za gusjenice malog voskovog moljca.

Wu i sur., 2017. utvrdili su da su EPN iz rodova *Heterorhabditis* i *Steinernema* otporne na miješanje sa tiametoksamom, što se slaže sa ovim istraživanjem. Osim toga Wu i sur. navode i da kombinacija *S. feltiae* s tiametoksamom ima sinergističko djelovanje protiv *Bradysia odoriphaga* i značajno veći mortalitet uzrokuje u odnosu na kombinaciju *H. bacteriophora* sa tiametoksamom. U ovom istraživanju utvrđeno je da postoji razlika između vrsta entomopatogenih nematoda s obzirom na njihovu kompatibilnost pri miješanju s tiametoksamom, ali ovisno o vremenskom periodu izloženosti navedenom insekticidu. Pri inkubaciji nematoda u otopini s tiametoksamom najviše do 3 sata, mortalitet nematoda je prihvatljiv, odnosno iznosi najviše do 14 % što je usporedivo s kontrolnim tretmanom.

Majić i sur. 2017. su u svom istraživanju koristili isti soj *H. bacteriophora* ISO9 ali u kombinaciji sa biljnim stimulatorom i bio-nematocidom. Doza koju su koristili je 150 % od preporučene. Vitalnost nematoda su promatrali kroz 1, 3, 24 i 72 sata. U kombinaciji sa bio-nematocidom Nemakey (Merkez Anadolu Kimya Ltd) promatrane nematode su nakon 3 sata izlaganja u toj otopini bile paralizirane. Što je inkubacija duže trajala te nematode su dostigle 100 % mortaliteta. Kod otopine u kombinaciji sa FPE (Fermented plant extracts, Multikraft), mortalitet se nije značajno razlikovao od kontrolnog tretmana a nematode su bile čak i živahne u toj otopini, što bi se čak i reklo da je to sredstvo djelovalo kao stimulans te bi se to moglo usporediti sa ovim istraživanjem gdje su *H. bacteriophora* ISO9 isto imale energične pokrete u odnosu na *S. feltiae* koja je bila toliko mirna da ih se moralo svaku posebno ispitati sa nematološkom „pecaljkom“ da se vidi da li su vitalne.

6. ZAKLJUČAK

- Obje vrste nematoda koje su se koristile za ovo istraživanje pokazale su otpornost na tiametoksam kroz 72 sata inkubacije u insekticidu;
- U ovom istraživanju utvrđeno je da postoji razlika između vrsta entomopatogenih nematoda s obzirom na njihovu kompatibilnost pri miješanju s tiametoksamom, ali ovisno o vremenskom periodu izloženosti navedenom insekticidu;
- Nakon miješanja s insekticidom, preživjele nematode su zadržale infektivnu sposobnost i patogenost;
- Pri inkubaciji nematoda u otopini s tiametoksamom najviše do 3 sata, mortalitet nematoda je prihvatljiv, odnosno iznosi najviše do 14 % što je usporedivo s kontrolnim tretmanom.
- Obje vrste nematoda mogu se miješati s insekticidom tiametoksam (Actara 25 WG) ali se preporučuju poljska istraživanja u realnim uvjetima i laboratorijska istraživanja na različitim vrstama štetnika kako bi se potvrdila ova tvrdnja.

7. POPIS LITERATURE

Bažok, R., Cvjetković, B., Sever, Z., Barić, K., Ostojić, Z. (2019.): Glasilo biljne zaštite, Hrvatsko društvo biljne zaštite, Zagreb.

Belien, T. (2018.): Entomopathogenic nematodes as biocontrol agents of insect pest in orchards. CAB reviews, 13 (58): 1-11.

Bokulić, A., Budinščak, Ž., Čelig, D., Deždek, B., Hamel, D., Ivić, D., Novak, M., Mrnjavčić Vojvoda, A., Nikl, N., Novak, N., Novaković, V., Pavunić Miljanović, Z., Peček, G., Poje, I., Prpić, I., Rehak, T., Ševar, M., Šimala, M., Turk, R. (2015.): Priručnik za sigurno rukovanje i primjenu sredstava za zaštitu bilja. Zagreb, Ministarstvo poljoprivrede.

Campos- Herrera, R. (2015.): Nematode pathogenesis of insects and other pests, Bari, Springer.

Carvalho, F. P. (2017.): Pesticides, environment, and food safety. Food and energy security, 6 (2): 48-60.

Chen, Z.X., Chen, S.Y., Dickson, D.W. (2004.): Nematology advances and perspectives Volume 2, Nematode management and utilization, CABI publishing, Cambridge.

Dilman, A.R., Chaston, J.M., Adams, B.J., Ciche, T.A., Goodrich-Blair, H., Stock, S.P., Sternberg, P.W. (2012.): An entomopathogenic nematode by any other name, PLOS pathogens, 8 (3): 1-4.

El Hassani, A. K., Dacher, M., Gary, V., Lambin, M., Gauthier, M., Armengaud, C. (2008.): Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the Honeybee (*Apis mellifera*), Arch Environ Contam Toxicol, 54: 653-661.

Gao, C-F., Ma, S-Z., Shan, C-H., Wu, S-F. (2014.): Thiamethoxam resistance selected in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae): Cross-resistance patterns, possible biochemical mechanisms and fitness costs analysis, Pesticide Biochemistry and Physiology, 111: 90-96.

Gaugler, R., (2002.): Entomopathogenic nematology, CABI publishing, New Jersey.

Gaugler, R., Bilgrami, A.L. (2004.): Nematode behaviour, CABI publishing, New Jersey.

- Gulcu, B., Cimen, H., Raja, R.K., Hazir, S. (2017.): Entomopathogenic nematodes and their mutualistic bacteria: Their ecology and application as microbial control agents, *Biopesticides International*, 13 (2): 79-112.
- Gutierrez, C., Campos-Herrera, R., Jimenez, J. (2008.): Comparative study of the effect of selected agrochemical products on *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae), *Departamento de Agroecologia, Madrid*, 18 (1): 101-108.
- Horowitz, A.R., Kontsedalov, S., Ishaaya, I. (2004.): Dynamics of Resistance to the Neonicotinoids Acetamiprid and Thiamethoxam in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae), *J. Econ. Entomol.* 97(6): 2051-2056.
- Koppenhofer, A.M., Fuzy, E.M. (2008.): Early timing and new combinations to increase the efficacy of neonicotinoid-entomopathogenic nematode (Rhabditida: Heterorhabditidae) combinations against white grubs (Coleoptera: Scarabaeidae), *Pest management science*, 64: 725-735.
- Koppenhofer, A.M., Grewal, P.S., Kaya, H.K. (2000.): Synergism of imidacloprid and entomopathogenic nematodes against white grubs: the mechanism, *Entomologia experimentalis et applicata*, 94: 283-293.
- Maienfish, P. (2006.): Synthesis and properties of thiametoxam and related compounds, *Zeitschrift fur Naturforschung*, 61: 353-359.
- Maienfish, P., Huerlimann, H., Rindlisbacher, A., Gsell, L., Dettwiler, H., Haettenschwiler, J., Sieger, E., Walti, M. (2001.): The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid, *Pest Management Science*, 57: 165-176.
- Majić, I. (2014.): Insekticidi u zaštiti bilja. U: Raspudić, E., *Biotehnološka rješenja u zaštiti bilja od štetnih kukaca*. Osijek, Grafika d.o.o., 46-50.
- Majić, I., Sarajlić, A., Lakatos, T., Toth, T., Raspudić, E., Kanižai Šarić, G., Laznik, Ž. (2017.): Compatibility of bio-nematicide and plant stimulant of microbial origin with *Heterorhabditis bacteriophora*, *CROSB*, 129: 125-129
- Miles, C., Blethen, C., Gaugler, R., Murray, T. (27.06.2014.): Using entomopathogenic nematodes for crop insect pest control, *A pacific northwest extension publication*, USA.
- Oštrec, Lj. (2001.): Biološko suzbijanje štetnih insekata entomopatogenim nematodama, *Agriculture Conspectus Scientificus*, 66 (3): 179-185.

Poinar Jr., G.O., Grewal, P.S. (2012.): History of entomopathogenic nematology, Journal of nematology 44 (2): 153-161.

Shapiro-Ilan, D.I., Han, R., Dolinski, C. (2012.): Entomopathogenic nematode production and application technology, Journal of nematology 44 (2): 206- 217.

Wu, H., Gong, Q., Fan, K., Sun, R., Xu, Y., Zhang, K. (2017.): Synergistic effect of entomopathogenic nematodes and thiamethoxam in controlling *Bradysia odoriphaga* Yang and Zang (Diptera: Sciaridae), Biological control, 111: 53-60.

Jedinice s interneta:

https://www.researchgate.net/profile/Randy_Gaugler/publication/263444652_Using_beneficial_nematodes_for_crop_insect_pest_control/links/0046353ad890787049000000.pdf

(Datum pristupa 10.08.2019.)

Hamilton, D. (2010.): Thiametoxam (245), Primary industries and fisheries, Australia.

http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation10/Thiamethoxam.pdf

(Datum pristupa 11.08.2019.)

8. SAŽETAK

Gotovo je nemoguće proizvesti dovoljno hrane da se prehrani svjetsko stanovništvo bez suzbijanja štetnih organizama. Suvremena poljoprivredna proizvodnja zahtijeva poticanje ekološki prihvatljivih metoda u suzbijanju štetnih organizama za biljke, u koju spadaju i entomopatogene nematode. Cilj ovog istraživanja je utvrditi kompatibilnost *Heterorhabditis bacteriophora* ISO9 i *Steinernema feltiae* ISO18 s insekticidom tiametoksam. Istraživanje je provedeno u laboratorijskim uvjetima, a svakih 1, 3, 24, 48 i 72 sata nakon inkubacije u insekticidu utvrđena je vitalnost i mortalitet entomopatogenih nematoda. Tretmani su postavljeni s preporučenom (100 %) koncentracijom insekticida i 20 % više od preporučene koncentracije insekticida. Pri inkubaciji nematoda u otopini s tiametoksamom najviše do 3 sata, mortalitet nematoda je prihvatljiv, odnosno iznosi najviše do 14 % što je usporedivo s kontrolnim tretmanom. Obje vrste testiranih nematoda su kompatibilne, odnosno mogu se miješati s insekticidom tiametoksam (Actara 25 WG), ali se preporučuju istraživanja realnim (poljska) uvjetima u i laboratorijska istraživanja na različitim vrstama štetnika kako bi se potvrdila ova tvrdnja.

Ključne riječi: *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema feltiae*, kompatibilnost, insekticid, tiametoksam, mortalitet

9. SUMMARY

It is almost impossible to produce enough food to feed the world's population without pest control. Modern agricultural production requires the promotion of environmentally friendly methods (such as entomopathogenic nematodes) in control of harmful organisms for plants. The aim of this study is to determine the compatibility of *Heterorhabditis bacteriophora* ISO9 and *Steinernema feltiae* ISO18 with thiamethoxam insecticide. The study was conducted under laboratory conditions, and the viability and mortality of entomopathogenic nematodes was determined every 1, 3, 24, 48 and 72 hours after nematodes incubation in the insecticide. Treatments were prepared as the recommended (100 %) insecticide concentration and 20 % higher than the recommended insecticide concentration (120 %). When incubating nematodes in solution with thiamethoxam for up to 3 hours, nematode mortality is acceptable, i.e. up to 14 %, which is comparable to the control treatment. Both types of nematodes tested are compatible, i.e. they can be mixed with the insecticide thiamethoxam (Actara 25 WG), but field research and laboratory testing on different pests is recommended to confirm this claim.

Key words: *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema feltiae*, compatibility, insecticide, thiamethoxam, mortality

PRILOZI

POPIS TABLICA

Tablica 1. GLM analiza mortaliteta *H. bacteriophora* kroz različiti vremenski period kroz različiti vremenski period proveden u insekticidu

Tablica 2. GLM analiza mortaliteta *S. feltiae* kroz različiti vremenski period proveden u insekticidu

Tablica 3. Srednje vrijednosti mortaliteta *H. bacteriophora* i *S. feltiae* vrsta u različitim koncentracijama insekticida

Tablica 4. Srednje vrijednosti mortaliteta nematoda ukupno za obje koncentracije insekticida i razlika između *H. bacteriophora* i *S. feltiae* u kompatibilnosti s insekticidom tiametoksam

POPIS SLIKA

Slika 1. Simbiotska bakterija u probavnom sustavu nematode

Slika 2. Veliki voskov moljac (*Galleria mellonella*) prije i poslije zaraze EPN

Slika 3. Životni ciklus EPN

Slika 4. Ličinke kukca zaražene s *Steinernema feltiae*

Slika 5. Ličinke velikog voskovog moljca (*G. mellonella*) zaražene s *H. bacteriophora* (A)
i svjetleća bakterija *P. luminescens* u probavi nematode (B)

Slika 6. Grčica hrušta (*Melolontha melolontha*) zdrava i zaražena s *H. bacteriophora*

Slika 7. White-ova zamka za izdvajanje nematoda

Slika 8. Nematode pod mikroskopom prije izdvajanja i centrifugiranja

Slika 9. Utvrđivanje mortaliteta nematoda

Slika 10. Postavljanje pokusa

Slika 11. EPN u Petrijevima zdjelicama sa različitim koncentracijama insekticida

Slika 12. Centrifuga potrebna za čišćenje i sedimentaciju nematoda

Utjecaj insekticida tiametoksam na entomopatogene nematode

Armando Vale

Sažetak: Gotovo je nemoguće proizvesti dovoljno hrane da se prehrani svjetsko stanovništvo bez suzbijanja štetnih organizama. Suvremena poljoprivredna proizvodnja zahtijeva poticanje ekološki prihvatljivih metoda u suzbijanju štetnih organizama za biljke, u koju spadaju i entomopatogene nematode. Cilj ovog istraživanja je utvrditi kompatibilnost *Heterorhabditis bacteriophora* ISO9 i *Steinernema feltiae* ISO18 s insekticidom tiametoksam. Istraživanje je provedeno u laboratorijskim uvjetima, a svakih 1, 3, 24, 48 i 72 sata nakon inkubacije u insekticidu utvrđena je vitalnost i mortalitet entomopatogenih nematoda. Tretmani su postavljeni s preporučenom (100 %) koncentracijom insekticida i 20 % više od preporučene koncentracije insekticida. Pri inkubaciji nematoda u otopini s tiametoksamom najviše do 3 sata, mortalitet nematoda je prihvatljiv, odnosno iznosi najviše do 14 % što je usporedivo s kontrolnim tretmanom. Obje vrste testiranih nematoda su kompatibilne, odnosno mogu se miješati s insekticidom tiametoksam (Actara 25 WG), ali se preporučuju istraživanja realnim (poljskim) uvjetima u i laboratorijska istraživanja na različitim vrstama štetnika kako bi se potvrdila ova tvrdnja.

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: izv.prof.dr.sc. Ivana Majić

Broj stranica: 31

Broj grafikona i slika: 12

Broj tablica: 4

Broj literaturnih navoda: 26

Broj priloga: 1

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema feltiae*, kompatibilnost, insekticid, tiametoksam, mortalitet

Datum obrane: 30.9.2019.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof. dr. sc. Emilija Raspudić, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Majić, mentor
3. doc. dr. sc. Ankica Sarajlić, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira Preloga 1, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek****Graduate thesis****Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek****University Graduate Studies Plant protection, course Plant protection****Effect of insecticide thiamethoxam on entomopathogenic nematodes**

Armando Vale

Abstract: It is almost impossible to produce enough food to feed the world's population without pest control. Modern agricultural production requires the promotion of environmentally friendly methods (such as entomopathogenic nematodes) in control of harmful organisms for plants. The aim of this study is to determine the compatibility of *Heterorhabditis bacteriophora* ISO9 and *Steinernema feltiae* ISO18 with thiamethoxam insecticide. The study was conducted under laboratory conditions, and the viability and mortality of entomopathogenic nematodes was determined every 1, 3, 24, 48 and 72 hours after nematodes incubation in the insecticide. Treatments were prepared as the recommended (100 %) insecticide concentration and 20 % higher than the recommended insecticide concentration (120 %). When incubating nematodes in solution with thiamethoxam for up to 3 hours, nematode mortality is acceptable, i.e. up to 14 %, which is comparable to the control treatment. Both types of nematodes tested are compatible, i.e. they can be mixed with the insecticide thiamethoxam (Actara 25 WG), but field research and laboratory testing on different pests is recommended to confirm this claim.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical Sciences in Osijek
Mentor: PhD Ivana Majić

Number of pages: 31**Number of figures:** 12**Number of tables:** 4**Number of references:** 26**Number of appendices:** 1**Original in:** Croatian

Key words: *Heterorhabditis bacteriophora*, *Steinernema feltiae*, mortality, insecticide, thiamethoxam, compatibility

Thesis defended on date: 30.9.2019.**Reviewers:**

1. PhD Emilija Raspudić, full professor, chair
2. PhD Ivana Majić, associate professor, mentor
3. PhD Ankica Sarajlić, assistant professor, member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1, Osijek